

*magc*

1635

Atty. Docket No.: 20200/2092 PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application of:	Kreutzer, et al.	Examiner:	B.A. Whiteman
Serial No.:	09/889,802	Group Art Unit:	1635
Filed:	September 17, 2001	Conf. No.:	8835
Entitled:	COMPOSITIONS AND METHODS FOR INHIBITING EXPRESSION OF A DEFINED GENE		

CERTIFICATE OF MAILING UNDER 37 C.F.R. § 1.8a

I hereby certify that this correspondence (and any paper or fee referred to as being enclosed) is being deposited with the United States Post Office as First Class Mail on the date indicated below in an envelope addressed to Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Elizabeth N. Spar

Name of Person Mailing Paper

Signature of Person Mailing Paper

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

TRANSMITTAL LETTER

Enclosed for filing in the above-identified patent application, please find the following priority documents:

1. Priority Document DE19903713.2;
2. Priority Document DE19956568.6; and
3. Return Post Card.

The Commissioner for Patents is hereby authorized to charge any additional fees or credit any overpayment in the total fees to Deposit Account No. 16-0085, Reference No. 20200/2092.
A duplicate of this transmittal letter is enclosed for this purpose.

Respectfully submitted,

Date: 10/14/03

Name: Elizabeth N. Spar
Registration No.: 45,123
Customer No.: 29933
Palmer & Dodge LLP
111 Huntington Avenue
Boston, MA 02199-7613
Tel: 617-239-0100

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 03 713.2

Anmeldetag: 30. Januar 1999

Anmelder/Inhaber: Dr. Roland Kreutzer, Weidenberg/DE;
Dr. Stefan Limmer, Bayreuth/DE.

Bezeichnung: Medikament zur Hemmung der Expression eines
vorgegebenen Gens

IPC: A 61 K, A 61 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wainet

Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens

Die Erfindung betrifft ein Medikament und eine Verwendung
5 doppelsträngiger Oligoribonukleotide.

Die DE 196 31 919 C2 beschreibt eine Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen, wobei die Anti-Sinn-RNA in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegt. Bei der Anti-Sinn-RNA
10 handelt es sich um ein RNA-Molekül das komplementär zu Bereichen der mRNA ist. Durch Bindung an diese Bereiche wird eine Hemmung der Genexpression bewirkt. Diese Hemmung kann insbesondere zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen, z.B. Tumorerkrankungen oder viralen Infektionen, eingesetzt werden.
15 - Die Anti-Sinn-RNA muß nachteiligerweise in einer Menge in die Zelle eingebracht werden, die mindestens genauso groß wie die Menge der mRNA ist. Die Wirksamkeit der bekannten Anti-Sinn-Verfahren ist nicht besonders hoch.

20 Aus der US 5,712,257 ist ein Medikament bekannt, das fehlgepaarte doppelsträngige RNA (dsRNA) und biologisch aktive fehlgepaarte Bruchstücke von dsRNA in Form eines ternären Komplexes mit einem oberflächenaktiven Mittel enthält. Die dabei verwendete dsRNA besteht aus synthetisch hergestellten
25 Nukleinsäureeinzelsträngen ohne definierte Basensequenz. Die Einzelstränge gehen zufällige Basenpaarungen miteinander ein, so dass fehlgepaarte Doppelstränge gebildet werden. Die bekannte dsRNA dient zur Hemmung der Vermehrung von Retroviren, wie HIV. Das Genom von Retroviren besteht aus doppelsträngiger RNA, die während der Vermehrung des Retrovirus verschiedene Proteine bindet. Die Bindung dieser Proteine und damit die Vermehrung des Virus kann gehemmt werden, wenn unspezifische dsRNA in hohen Konzentrationen in die infizierten Zellen
30

eingebracht wird. Es kommt dabei zu einer Konkurrenz der unspezifischen dsRNA mit der doppelsträngigen Virus-RNA. Der hemmende Effekt bzw. die Wirksamkeit dieses Verfahrens ist gering.

5

Aus Fire, A. et.al, NATURE, Vol. 391, pp. 806 ist es bekannt, dass dsRNA, deren einer Strang abschnittsweise komplementär zu einem zu hemmenden Gen eines Fadenwurms ist, die Expression dieses Gens mit einer hohen Wirksamkeit hemmt. Es wird die 10 Auffassung vertreten, dass die besondere Wirksamkeit der verwendeten dsRNA in Zellen des Fadenwurms nicht auf dem Anti-Sinn-Prinzip beruht, sondern möglicherweise auf katalytische Eigenschaften der dsRNA zurückzuführen ist. - Über die Wirksamkeit spezifischer dsRNA in bezug auf die Hemmung der 15 Genexpression, insbesondere in humanen Zellen, ist in diesem Artikel nichts ausgesagt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein möglichst wirksames Medikament bzw. eine möglichst wirksame Verwendung zur Herstellung eines Medikaments angegeben werden, mit dem/der eine Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens bewirkbar ist.

25 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 2, 13 und 14 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Ansprüchen 3 bis 12 und 15 bis 26.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament mit mindestens 30 einem doppelsträngigen Oligoribonukleotid (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Es hat sich überraschend gezeigt, dass

dsRNA sich als Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens in humanen Zellen eignet. Die Hemmung wird im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotid 5 bereits bei Konzentrationen bewirkt, die um mindestens eine Größenordnung niedriger sind. Das erfindungsgemäße Medikament ist hoch wirksam. Es sind geringere Nebenwirkungen zu erwarten.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament mit 10 mindestens einem Vektor zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Das 15 vorgeschlagene Medikament weist die vorgenannten Vorteile auf. Durch die Verwendung eines Vektors können insbesondere Herstellungskosten eingespart werden.

Sofern dsRNA als Wirkstoff benutzt wird, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, dass die dsRNA verpackt in micellare 20 Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt. Die dsRNA kann gleichfalls in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen sein. - Die vorgenannten Merkmale ermöglichen ein Einschleusen 25 der dsRNA in vorgegebene Zielzellen.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal weist die dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 250 bis 350, Basenpaare auf. Eine solche dsRNA bzw. ein zur Kodierung derselben vorgesehener Vektor 30 können synthetisch bzw. enzymatisch mit gängigen Verfahren hergestellt werden.

Das zu hemmende Gen, vorzugsweise ein Onkogen, kann in eukaryontischen Zellen oder in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar sein. Es kann Bestandteil eines, vorzugsweise humanpathogenen, Virus oder Viroids sein.

- 5 - Das vorgeschlagene Medikament erlaubt die Therapie genetisch gesteuerter Krankheiten, z.B. Krebs und viral erkrankungen.

10 Das Virus oder Viroid kann auch ein tier- oder planzenpathogenes Virus oder Viroid sein. In diesem Fall erlaubt das erfundungsgemäße Medikament auch die Behandlung von Tier- oder Pflanzenkrankheiten.

15 Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet. Ihre Enden können zur Verhinderung eines Abbaus in der Zelle modifiziert sein. Dadurch wird ein enzymatischer Angriff erschwert.

20 Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Verwendung doppelsträngiger Oligoribonukleotide zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Überraschenderweise eignet sich dsRNA zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens. Bei einer Verwendung von dsRNA wird die Hemmung im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotide schon bei um eine Größenordnung geringeren Konzentrationen bewirkt. Die erfundungsgemäße Verwendung ermöglicht also die Herstellung besonders wirksamer Medikamente.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist die Verwendung eines Vektors zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide

(dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Die Verwendung eines Vektors ermöglicht die Herstellung besonders preisgünstiger und wirksamer Medikamente.

Hinsichtlich der verwendungsgemäßen Ausgestaltungen wird auf die Beschreibung der vorangegangenen Merkmale verwiesen.

10 Ausführungsbeispiel:

Mittels herkömmlicher Verfahren ist ein aus dem einzigen Sequenzprotokoll ersichtlicher RNA-Einzelstrang enzymatisch synthetisiert worden.

15

Ferner ist der dazu komplementäre RNA-Einzelstrang synthetisiert worden. Anschließend sind der Einzelstrang und der dazu komplementäre Einzelstrang zur dsRNA vereinigt worden. Die so hergestellte dsRNA enthält einen Abschnitt des "immediate early gene" des Cytomegalievirus.

Versuchsprotokoll:

Es wurde ein Plasmid-Vektor konstruiert, unter dessen Verwendung die benötigte dsRNA hergestellt werden konnte. Für die Konstruktion dieses T7/SP6-Transkriptionsplasmides wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der 363 Basenpaare vom 5'-Ende des "immediate early gene's" des Cytomegalievirus durchgeführt. Als Matrize diente käuflich erwerbbliche "positive control DNA" aus dem Cytomegalievirus des HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* Transkriptionskit's der Fa. Promega. Als Primer dienten Oligodesoxyribonukleotide, deren Sequenz identisch mit bzw. komplementär zu den Enden des oben angegebenen Bereichs des "immediate early gene's"

waren. Als Klonierungsvektor für das erhaltene PCR-Produkt diente der Vektor pGEM[®]-T (Fa. Promega). Es erfolgte Transformation von *E. coli* XL1-blue. Plasmid-DNA eines ausgewählten Klons, deren Sequenz durch partielle Sequenzierung überprüft worden war, wurde mit *Nco*I bzw. *Sal*I linearisiert und als Matrize für eine *in vitro*-Transkription mit SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase verwendet (RiboMAX™ *in vitro*-Transkriptionskit, Fa. Promega).

Die erhaltenen Oligoribonukleotide wurden gereinigt und in Natriumphosphatpuffer (pH 6,5) in Gegenwart von 100 mM NaCl in äquimolaren Mengen zusammengegeben. Nach kurzem Erhitzen auf 95°C wurde die Mischung über einen Zeitraum von ca. 2,5 Stunden langsam abgekühlt, wodurch die Bildung von dsRNA durch Paarung der beiden komplementären Einzelstränge erreicht wurde.

Testsystem mit menschlichem Zellkernextrakt:

Unter Verwendung des HeLaScribe[®] Nuclear Extract *in vitro* Transkriptionskit's der Fa. Promega wurde die Transkriptionseffizienz des oben angegebenen Bereichs des "immediate early gene's" des Cytomegalievirus in Gegenwart der beiden einzelsträngigen Oligoribonukleotide sowie der dsRNA bestimmt. Dies erfolgte anhand der in die "run off"-Transkripte inkorporierten Radioaktivität des als Substrat verwendeten [α^{32} P] ATP. Die Trennung des freien ATP vom entstandenen Transkript wurde mittels Gelelektrophorese vorgenommen. Die Auswertung des Gels erfolgte mit Hilfe eines Radioaktivitätsdetektors (Instant-Imager).

30

Ergebnis und Schlussfolgerung:

Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der Menge an Transkript in Gegenwart von dsRNA im Vergleich zum Kontrol-

lansatz ohne RNA sowie auch zu den Ansätzen mit einzelsträngiger RNA. Die Wirksamkeit der dsRNA war schon bei Zugabe von geringen Mengen, nämlich weniger als 10% der bei der Antisinn-Technologie zur Hemmung der Translation erforderlichen 5 RNA-Konzentration, zu erreichen. Der hemmende Effekt einzelsträngiger Antisinn-RNA wäre in diesem Testsystem nicht nachzuweisen, da hierbei die Inhibition auf der Ebene der Translation stattfindet. Hier wurde die Transkription untersucht. Die hiermit erstmals beim Menschen beobachtete Reduzierung 10 der Transkript-Menge eines Gens in Gegenwart von dsRNA zeigt deutlich eine Hemmung der Expression des entsprechenden Gens an. Dieser Effekt ist auf einen neuartigen, durch die dsRNA bedingten Mechanismus zurückzuführen.

15

Patentansprüche

1. Medikament mit mindestens einem doppelsträngigen Oligoribonukleotid (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.
- 5
2. Medikament mit mindestens einem Vektor zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.
- 10
3. Medikament nach Anspruch 1, wobei die dsRNA verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.
- 15
4. Medikament nach Anspruch 1, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.
- 20
5. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 250 bis 350, Basenpaare aufweist.
- 25
6. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zu hemmende Gen, vorzugsweise ein Onkogen, in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.
- 30
7. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zu hemmende Gen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.

8. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zu hemmende Gen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

5

9. Medikament nach Anspruch 8, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

10
10

10. Medikament nach Anspruch 8, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

15

11. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.

20

12. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Enden der dsRNA zur Verhinderung eines Abbaus in der Zelle modifiziert sind.

25

13. Verwendung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.

30

14. Verwendung eines Vektors zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.

15. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die dsRNA verpackt in micellaren Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.
- 5 16. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.
- 10 17. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 250 bis 350, Basenpaare aufweist.
- 15 18. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 17, wobei das zu hemmende Gen, vorzugsweise ein Onkogen, in eukaryontischen Zellen exprimiert wird.
- 20 19. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 18, wobei das zu hemmende Gen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.
- 25 20. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 19, wobei das zu hemmende Gen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 30 22. Verwendung nach Anspruch 20, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 22, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.

5 24. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 23, wobei die Enden der dsRNA zur Verhinderung eines Abbaus in der Zelle modifiziert sind.

10 25. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 24, wobei das Medikament in die Blutbahn oder das Interstitium des zu therapierenden Organismus injizierbar ist.

15 26. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 25, wobei die dsRNA bzw. der sie kodierende Vektor in Bakterien oder Mikroorganismen aufgenommen sind.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Medikament mit mindestens einem doppelsträngigen Oligoribonukleotid (dsRNA) zur Hemmung der
5 Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Kreutzer, Roland
Limmer, Stefan

<120> Medikament zur Hemmung der Expression eines
vorgegebenen Gens

<130> 380606

<140>
<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung des Moleküls der DNA/RNA-Kombination:
synthetische dsRNA

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: dsRNA

<400> 1

tcagatctc agaagttta atgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag 60
gcaccgtta taaaatctaa caatgcgctc atcgtcatcc tcggcaccgt caccctggat 120
gctgtaggca taggcttgggt tatgccggta ctgccgggc tcttgcggga tatcgccat 180
tccgacagca tcgccagtca ctatggcggtg ctgctagcgc tatatgcgtt gatgcaattt 240
ctatgcgcac ccgttctcggt agcactgtcc gaccgctttt gccggggccc agtcctgctc 300
gcttcgctac ttggagccac tatcgactac gcgatcatgg cgaccacacc cgtcctgtgg 360
atc

363